

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 août 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/066492 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K (74) Mandataire : MONAIN, Patrice; Sanofi-Synthelabo, 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/00638 (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 20 février 2002 (20.02.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/02291 20 février 2001 (20.02.2001) FR (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : SANOFI-SYNTHELABO [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE MARSEILLE [FR/FR]; 80, rue brochier, F-13005 Marseille (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : Martin, Pierre, Marie [FR/FR]; 79, avenue de Montredon, F-13008 Marseille (FR). OUAFIK, L'Houcine [FR/FR]; 11, rue Louis Braille, F-13005 Marseille (FR).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: HUMAN ADRENOMEDULLIN-SPECIFIC ANTIBODY, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME, THERAPEUTIC USES THEREOF

(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUE DE L'ADRENOMEDULLINE HUMAINE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT, SES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.

(57) Abstract: The invention concerns an adrenomedullin-specific antibody, for use in cancer treatment. The invention also concerns pharmaceutical compositions containing an anti-adrenomedullin antibody and their therapeutic uses.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à un anticorps spécifique de l'adrénomedulline, utile dans le traitement de cancers. L'invention se rapporte également à des compositions pharmaceutiques contenant un anticorps anti-adrénomedulline et à leurs applications thérapeutiques.

WO 02/066492 A2

Anticorps spécifique de l'adrénomédulline humaine, composition pharmaceutique le contenant, ses applications thérapeutiques.

L'invention se rapporte au traitement du cancer.

5 Le glioblastome est l'une des tumeurs du cerveau la plus courante chez l'homme, et se distingue des astrocytomes par la présence de nécroses et de proliférations vasculaires (Brain tumors, pp 433-478, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1995). Les traitements actuellement disponibles ne sont malheureusement que d'une efficacité limitée pour ces tumeurs et le pronostic est
10 par conséquent défavorable.

On sait que les facteurs de croissance régulent la prolifération et la différenciation cellulaires et sont directement impliqués dans la transformation néoplasique (Ann. Intern. Med. 117 : 408-414, 1992). L'une des caractéristiques communes de beaucoup de ces peptides (hormones, facteurs de croissance,
15 enzymes), essentielle à leur fonction dans la communication intracellulaire, est la présence d'un groupe α -amide à l'extrémité carboxyle (Trends Biochem. Sci., 16 : 112-115, 1991).

Un seul complexe enzymatique, la peptidylglycine α -amidante monooxygénase (PAM) est responsable de l' α -amidation de ces peptides et
20 hormones (Annu. Rev. Neurosci. 15 : 57-85, 1992). Une activité PAM a ainsi été trouvée dans des tumeurs endocrines sécrétant des peptides α -amidés, notamment dans le carcinome thyroïdien médullaire, le phéochromocytome (Mol. Cell. Endocrinology, 79 : 53-63, 1991), les tumeurs pancréatiques sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIP) (Clinical Endocrinology, 33 : 467-480, 1990), et chez
25 l'homme dans des tumeurs hypophysaires (Metabolism, 34 : 1044-1052, 1985).

L'adrénomédulline (AM) est un peptide présentant des homologies avec le peptide couplé au gène de la calcitonine (CGRP) (de l'anglais "calcitonin gene-related") et a été classée de ce fait dans la famille calcitonine / CGRP / amyline (Crit. Rev. Neurobiol., 11 : 167-239, 1997). AM est exprimée dans de nombreux
30 tissus, notamment la medulla de la glande surrénale, les poumons, les reins, et l'atrium cardiaque (FEBS Lett, 352 : 105-108, 1994). AM a été montré induisant une réponse multiple sur cultures cellulaires et modèles animaux avec modulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et induction de l'angiogenèse.

L'expression de AM a également été mise en évidence dans différentes
35 tumeurs humaines d'origine neurale ou pulmonaire, notamment le cancer du

poumon à petites cellules, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome et le neuroblastome (Endocrinology, 136 : 4099-4105, 1995).

AM pourrait être impliquée dans la genèse des tumeurs. Deux lignées
5 cellulaires transformées de glioblastome (T98G et A172) ont été montrées capables d'exprimer et de sécréter AM (Peptides, 18 : 1117-1124, 1997; J. Biol. Chem., 271 : 23345-23351, 1996).

Il a été également montré que AM et son récepteur (AM-R) sont exprimés de façon ubiquitaire pendant l'embryogenèse et la carcinogenèse. Trois récepteurs (L1,
10 RDC1 et un récepteur apparenté au récepteur de la calcitonine CRLR), présentant différentes affinités pour AM, ont été clonés et séquencés (J. Biol. Chem., 270 : 24344-25347, 1995). Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. CRLR nécessite la présence de protéines partenaires possédant un seul domaine transmembranaire et appelées
15 protéines modifiant l'activité de récepteur (RAMPs) (Nature (Lond.), 393 : 333-339, 1998). L'association du CRLR et des protéines RAMP spécifie la nature des ligands liés à ce complexe. Associé à RAMP1, CRLR est sous forme mature, pleinement glycosylé et lie le CGRP. Associé à RAMP2 ou RAMP3, CRLR est sous forme immature partiellement glycosylé et peut lier l'AM. Dans le cas d'une association
20 avec RAMP3, CRLR présente aussi une affinité pour l'amyline.

Bien qu'une sur-expression de AM ait été mise en évidence dans plusieurs tumeurs (J. Clin. Endocrinol. Metabol., 80 : 1750-1752, 1995), les effets réels de AM sur la genèse des tumeurs restent inconnus.

Il existe donc toujours aujourd'hui un besoin en des traitements capables de
25 ralentir ou de stopper le développement de tumeurs cancéreuses.

Il existe toujours également un besoin en des méthodes utiles pour mettre en évidence des composés utilisables dans le traitement de cancers.

L'invention vise à répondre à ce besoin.

Un premier objet de l'invention est de fournir des anticorps spécifiques de
30 AM humaine ou anticorps anti-AM.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'anticorps spécifiques de AM humaine dans le traitement de cancers.

Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant des anticorps spécifiques de AM humaine destinée au traitement de
35 cancers.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'anticorps spécifiques pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de AM dans un test biologique pour mettre en évidence des composés capables de moduler l'activité de
5 AM.

Selon l'invention, il a été trouvé que les anticorps anti-AM possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*.

Selon l'invention, il a été trouvé également que AM possède un rôle dans le processus d'angiogénèse et que les anticorps anti-AM peuvent être utilisés n tant
10 qu'agent anti-angiogénèse.

Selon un premier aspect, l'invention concerne un anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine.

L'anticorps anti-AM selon l'invention peut être monoclonal ou polyclonal. Les techniques classiques de production d'un anticorps peuvent être utilisées dans le
15 cadre de l'invention.

Par exemple, des anticorps dirigés contre AM peuvent être obtenus en administrant le peptide AM ou un ou plusieurs fragments de AM portant des épitopes à des cellules ou des animaux, en utilisant les techniques classiques.

Le choix des animaux utilisés pour la production d'anticorps n'est pas limitatif
20 en soi. Il peut s'agir par exemple de souris, de chèvre, de lapin.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, les techniques fournissant des anticorps produits par des cultures de lignées cellulaires en continu peuvent être utilisées. Des exemples de techniques comprennent la technique des hybridomes (Kohler, G. , Milstein, C., Nature, 256 : 495-497, 1975), la technique des trioma, la
25 technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4 : 72, 1983) et la technique des hybridomes EBV (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

On peut également préparer les anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire, par recombinaison génétique, à partir de banques de cellules souches
30 humaines ou par la technique de "phage display".

Des anticorps chimériques peuvent également être préparés, en utilisant des anticorps monoclonaux humains comportant des parties variables de souris ou d'autres espèces, spécifiques de l'AM humaine.

Les techniques pour la production d'anticorps à chaîne unique (U.S. Patent No.
35 4,946,778) peuvent également être adaptées pour produire les anticorps de l'invention.

Egalement, les souris transgéniques ou d'autres organismes incluant des mammifères différents, peuvent être utilisées.

Selon un autre aspect, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif un anticorps, ou un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM.

La composition selon l'invention est en particulier destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.

On citera à titre illustratif et non limitatif le cancer de la prostate, le cancer des ovaires, le traitement des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

Les anticorps ou fragments de ceux-ci spécifiques de l'AM, contenus dans les compositions selon l'invention, peuvent également être utilisés en tant qu'agents anti-angiogénèse.

Les demandeurs ont en effet mis en évidence dans des études immunohistochimiques réalisées avec un anticorps anti-Facteur VIII, qui est un marqueur de cellules endothéliales, que des tumeurs traitées avec l'anticorps anti-AM de l'invention sont globalement moins vascularisées que les tumeurs contrôles, et que le réseau vasculaire présente une certaine désorganisation.

La surface vasculaire des tumeurs contrôles est ainsi très supérieure à celle des tumeurs traitées avec l'anticorps anti-AM. Ces résultats montrent l'implication originale de l'AM dans la mise en place et le maintien d'un réseau tumoral et peritumoral stable et fonctionnel.

La composition selon l'invention est de préférence administrée par voie injectable, notamment par voie intra-veineuse, sous-cutanée, ou par administration dans le réseau lymphatique.

La quantité de principe actif à administrer dépend du degré d'avancement de la pathologie à traiter, ainsi que de l'âge et du poids du patient. Néanmoins, les doses unitaires comprennent généralement de 1 µg à 1 g, avantageusement de 10 mg à 100 mg de principe actif. Ces doses unitaires sont administrées normalement en une ou plusieurs fois par jour, de préférence de une à trois fois par jour.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine, pour utilisation en tant que principe actif d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.

Plus particulièrement, l'anticorps selon l'invention est destiné au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps, ou d'un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.

Selon l'invention, cette utilisation est destinée au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

L'utilité des anticorps de l'invention en tant qu'agents anti-angiogénèse résulte de la mise en évidence par les demandeurs du rôle de l'AM dans le processus d'angiogénèse.

Cette implication de l'AM est démontrée à plusieurs niveaux, en utilisant des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC).

L'AM stimule ainsi la prolifération des cellules HUVEC d'une façon très significative après six jours ($p < 0,0001$) de traitement de ces cellules par AM. L'AM induit également la migration des cellules HUVEC d'une manière très significative ($p < 0,0001$) par rapport aux cellules contrôles non traitées par AM (test de migration effectué sur membrane dans des chambres Boyden). Les effets des cellules traitées avec AM sont plus importants que ceux provoqués par le FGF (Fibroblast Growth Factor, où $p = 0,0092$).

Un traitement réalisé avec les deux facteurs montre un effet additif suggérant l'activation de deux voies indépendantes qui seraient à l'origine de la migration ($p = 0,0002$).

L'AM induit également l'organisation des cellules HUVEC en microtubules, comme dans les cas de traitement avec le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), après culture des cellules HUVEC sur une matrice extracellulaire Matrigel suivie d'un traitement avec l'AM et / ou le VEGF.

L'AM induit enfin *in vivo*, dans un modèle animal après implantation sous cutanée d'une solution de Matrigel, une infiltration massive des cellules dans le Matrigel et dans certaines régions la formation de microvaisseaux est observée.

L'AM possède par conséquent des propriétés angiogéniques. L'utilisation d'anticorps anti-AM, qui inhibent l'interaction de l'AM avec ses récepteurs et, par conséquent, tout effet biologique de l'AM, bloque ainsi la mise en place d'un réseau vasculaire stable et fonctionnel nécessaire à la croissance tumorale.

5 Un autre aspect de l'invention concerne donc l'utilisation de l'AM dans un test biologique, pour la mise en évidence de composés capables de moduler l'action de l'AM sur l'angiogénèse ou sur la croissance tumorale.

Par exemple, un test selon l'invention comprend les étapes consistant à

- a) mettre en contact un composé candidat avec des cellules qui expriment l'AM ou répondent à l'AM, et
- 10 b) observer la fixation, ou la stimulation ou l'inhibition d'une réponse fonctionnelle, ou comparer la réponse des cellules mises en contact avec le composé candidat avec les mêmes cellules qui ne sont pas mises en contact avec le composé candidat.

15 Le test de l'invention, en utilisant des techniques classiques en elles-mêmes d'expression de peptides dans des cultures cellulaires et connues de l'homme du métier, permet donc de rechercher des composés, en particulier des petites molécules capables d'avoir notamment une action inhibitrice (antagoniste) sur l'angiogénèse induite par l'AM et donc de bloquer le développement du réseau vasculaire nécessaire à la croissance tumorale, ou sur la croissance tumorale elle-même.

Des caractéristiques et avantages supplémentaires de l'invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit, faite en relation avec les figures dans lesquelles :

25 La figure 1 représente l'analyse densitométrique de l'expression de l'ARNm de PAM dans le gliome humain, les lignées cellulaires glioblastomales et les tissus de cerveau non tumoral. L'ARN total (20 µg) est séparé par électrophorèse sur gel dénaturant agarose (1 %) - formaldéhyde et transféré sur une membrane Hybond-N et hybridés avec une sonde d'ADNc humain de PAM de 2,2 kb. Les membranes
30 sont ensuite exposées en autoradiographie pendant 24 h. En contrôle, après décrochage, les membranes sont réhybridées avec une sonde d'ADNc produite à partir d'ARN ribosomal 18S de grenouille. Sur la figure 1 A et B, la quantité d'ARNm de PAM est normalisée à la quantité d'ARN ribosomal 18S. Les résultats correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

35 NB : cerveau normal; GGIV : gliome de degré IV; GGII : gliome de degré II.

La figure 2 représente une mesure de l'expression de l'ARNm de AM dans des lignées glioblastomales et dans le cerveau normal. L'ARN total (15 µg) préparé à partir de lignées cellulaires de glioblastomes et de cerveau est analysé par Northern Blot. Les membranes sont hybridées avec une sonde d'ADNc de AM humain, puis après décrochage, réhybridées avec un contrôle ADNc 18S ribosomal pour la normalisation. Sur la figure 2, la quantité d'ARNm de AM indiquée est normalisée à la quantité d'ARN ribosomal 18S. Les résultats correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

La figure 3 représente l'analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de AM dans les gliomes. Les ARN totaux extraits d'oligodendrogliome et de glioblastome sont rétrotranscrits en ADNc puis analysés par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression d'un contrôle interne, la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase).

La figure 4 représente l'inhibition de la reconnaissance de AM radiomarké avec I^{125} par l'anticorps anti-AM. Des cellules glioblastomales (U87) sont incubées pendant 120 min à 25°C en présence de I^{125} -AM (60 µci µg⁻¹; 7 x 10⁴ cpm par test) et des concentrations croissantes de l'anticorps. Chaque point est le résultat de trois expériences.

La figure 5 représente les effets de AM et de l'anticorps anti-AM sur la prolifération des cellules U87 (Fig. 5A) et U373 (Fig. 5B) *in vitro*. Les cellules tumorales sontensemencées à une densité de 6 x 10³ cellules par puit dans des plaques 12 puits en présence de milieu MEM additionné de 2 % de FBS, 2 mM de glutamine et d'antibiotiques. On ajoute AM à une concentration de 2 x 10⁻⁷ M et l'anticorps anti-AM "AMAb2" (12 µg /ml) en présence ou non de AM (10 µM). Sur la figure 5, C représente les cellules non traitées. Les contrôles sont constitués de "AMAb2" dénaturé par la chaleur et de IgG (Ed.1) non relevant. Pour chaque traitement, six points sont employés pour la mesure MTT et six points sont employés pour le comptage des cellules dans un compteur Coulter. Les barres verticales représentent SEM.

** : p < 0,007 ; *** : p < 0,0001.

La figure 6 représente le traitement avec l'anticorps anti-adrenomedulline de xenografts de tumeurs humaines établies. Des souris porteuses de tumeurs U87, de taille approximative de 1350 +/- 100 mm³, reçoivent deux fois par semaine un traitement intra tumoral de 200 µg de AMAb2 (n=20) ou un contrôle d'IgG non relevant (n=7). Les souris non traitées avec AMAb2 sont sacrifiées entre 21 et 24-

jours, en raison de la grosseur des tumeurs. Le volume moyen des tumeurs pendant une période de plus de 70 jours est montré sur la figure 6. Les grosseurs des tumeurs dans le groupe traité au PBS ne sont pas différentes de celles obtenues dans le groupe traité avec l'IgG contrôle non relevant.

5 Culture cellulaire et tests de prolifération cellulaire.

Les lignées cellulaires de glioblastome humain sont obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) et sont cultivées en milieu essentiel minimal (MEM) (U373, U138, U87) ou dans du milieu L15 (SW1783 et SW1088), disponibles auprès de la société Life Technologies, Paris, France, en
10 présence de pénicilline (50 U / ml), de streptomycine (50 µg / ml), de glutamine (1 mg / ml) et de sérum de veau fœtal (10 %). Les cellules sont cultivées dans une atmosphère humide 95% air / 5 % CO₂. Le milieu de culture est changé tous les deux jours. L'activité d'amidation et les ARNs sont préparés lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Les effets de CGRP₈₋₃₇, AM₂₂₋₅₂, AM₁₋₅₂ et de
15 l'anticorps de lapin anti-AM sur la prolifération cellulaire sont examinés aux temps indiqués par le test MTT bromure de 3-(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolum (Cancer Res. 49: 4435-4440, 1989) (Cancer Res. 47 : 943-946, 1987). Les résultats sont exprimés en pourcentages des rapports T/C, où T est la densité optique (OD₅₇₀) des cultures traitées (milieu MEM et CGRP₈₋₃₇, AM₂₂₋₅₂, AM₁₋₅₂ ou
20 anticorps de lapin anti-AM) et C est la densité optique (OD₅₇₀) des cultures non traitées (milieu MEM seul).

Patients et préparation des tissus.

Des tissus tumoraux de patients opérés pour des gliomes sont étudiés. 5 gliomes de degré II (degré faible), 7 oligodendrogliomes anaplasiques et 13
25 glioblastomes (degré IV) (selon la classification histopathologique WHO) sont utilisés. Les échantillons de tumeurs sont recueillis au moment de l'intervention chirurgicale et conservés immédiatement dans l'azote liquide jusqu'à extraction des ARNs. Un tissu télencéphalique normal est prélevé sur un patient opéré dans le cadre d'un traitement contre l'épilepsie. Tous les protocoles de prélèvement de
30 tissus ont été réalisés selon les exigences des comités institutionnels et avec l'accord des patients.

Analyse par Northern Blot.

L'extraction des ARNs totaux est réalisée à partir des gliomes humains, du tissu télencéphalique normal et des lignées cellulaires en utilisant la méthode à

l'isothiocyanate de guanidinium / phénol / chloroforme (Anal. Biochem., 162 : 156-159, 1987) avant analyse par Northern Blot.

Préparation des extraits de tissus et test d'amidation.

Les cellules sont décollées et recueillies en tampon PBS froid, et préparées
5 pour un test d'amidation.

Extraction des peptides et radioimmunoessai.

Pour mesurer l'immunomarquage anti-AM (IR-AM), les cellules sont préparées selon la procédure décrite dans FEBS Lett., 352 : 105-108, 1994. La caractérisation chromatographique de IR-AM dans le milieu de culture est réalisée
10 par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, en utilisant une colonne μ Bondapak C18 (3,9 x 300 mm; Waters). Le milieu conditionné (15 ml) est extrait en utilisant des cartouches Sep-Pak C18. L'extrait est reconstitué avec une solution contenant 0,1 % (vol / vol) d'acide trifluoroacétique et chargé sur la colonne. L'analyse est réalisée avec un gradient linéaire d'acétonitrile contenant 0,1 % (vol /
15 vol) d'acide trifluoroacétique, de 10 à 60 % à une vitesse de 1 ml / min / fraction pendant 50 min. Chaque fraction (1 ml) est recueillie, séchée et analysée.

RT-PCR quantitative.

Une méthode de RT-PCR (réaction de polymérase en chaîne) quantitative en temps réel est utilisée pour mesurer les variations du nombre de copies de AM
20 ou GAPDH. L'ARN total (2 μ g) libre d'ADN est transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en présence d'un μ g d'hexamères (Pharmacia Biotech, Orsay, France) et de la transcriptase inverse MMLV (de l'anglais "Moloney leukemia virus"), tel que décrit par Life Technologies Inc., Paris, France. De l'ARNm d'AM et de GAPDH humaine est amplifié (AM : amorce sens 5'-TGCCCAGACCCTTATTCGG-3' et amorce
25 antisens 5'-AGTTGTTTCATGCTCTGGCGG-3'; GAPDH : amorce sens 5'-CAAATTCCATGGCACCCTC-3' et amorce antisens 5'-CCCATCTGATTTTGGAGGGA-3'), et quantifié en temps réel en utilisant le système de détection ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les sondes Taq Man pour AM et GAPDH sont 5'-
30 ACATGAAGGGTGCCTCTCGAAGCCC-3' et 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' respectivement. Le mélange d'amplification contient l'ADNc produit à partir de 50-150 ng de l'ARN total, 0,2 μ M d'amorce, et 0,1 μ M de sonde Taq Man dans 50 mM de NaCl et 5 mM de Mg^{2+} . Une PCR en deux étapes est réalisée à 35 cycles. La dénaturation est faite à 94°C
35 pendant 20 sec, et la fixation des amorces sur la matrice / extension à 60°C pendant

30 sec. La réaction produit un produit PCR de 115 paires de base (bp) pour AM et de 101 bp pour GAPDH. Pour quantifier les résultats, des niveaux d'ARNm de AM sont normalisés aux niveaux d'ARNm de GAPDH dans la même réaction. Pour créer des courbes standard pour chaque gène, les ARNs sont produits par transcription *in vitro* à partir des matrices ADNc linéarisés de AM et de GAPDH par les polymérases T7 ou T3 puis rétrotranscrits en ADNc. En utilisant des sondes AM et GAPDH marquées par des fluorochromes dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, une relation linéaire entre la concentration en ARN rétrotranscrit en ADNc et le signal de fluorescence (ΔRQ) des ARNs de AM et GAPDH dans 1-250 pg d'ADN cible est obtenue. Pour chaque échantillon inconnu, les valeurs ΔRQ sont déterminées pour les deux gènes, et les résultats sont exprimés en fg de AM par pg de GAPDH.

Analyse par RT-PCR des ARNm de CRLR et RAMP.

Des amorces telles que définies dans le tableau 1 figurant en annexe de la présente demande de brevet sont sélectionnées pour être spécifiques de CRLR, RAMP2 et RAMP3. Les réactions de PCR initiées par les jeux d'amorces spécifiques pour CRLR, RAMP2 et RAMP3 sont réalisées avec de l'ADNc produit à partir de lignées cellulaires de gliome et d'échantillon prélevé sur un gliome humain. Les paramètres de cycles sont les suivants :

Etape de dénaturation initiale : 94°C, 5 min,

35 cycles : fixation des amorces sur la matrice : 40 sec. puis extension / polymérisation à 68°C, 50 sec., puis dénaturation 94°C, 30 sec., la dernière extension étant prolongée de 10 min. Les températures de fixation des amorces sur la matrice dépendent du couple d'amorces utilisé et sont indiquées dans le tableau 1. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % dans un tampon Tris / borate contenant 0,5 µg / ml de bromure d'éthidium; les gels sont rincés en tampon NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N pendant 15 min et ensuite pendant 30 min dans Tris-HCl 1 M, pH 8,0, NaCl 1,5 M avant transfert sur une membrane Hybond-N. Les filtres sont mis à hybrider avec les sondes indiquées dans le tableau 1, lavés et mis en autoradiographie.

Production des anticorps anti-AM.

Des lapins néo-zélandais femelles sont immunisés trois fois en sous-cutané avec de l'AM humaine (Bachem) (120 µg AM équivalent par injection : la première dose dans un adjuvant de Freund complet, les deux dernières dans un adjuvant de Freund incomplet). Les sérums sont sélectionnés pour leur activité anti-AM, puis

purifiés par affinité sur colonne de protéine A Sépharose (Amersham Pharmacia Biotech).

Reconnaissance de AM marqué à I^{125} .

Des cellules de glioblastome sont cultivées dans des plaques 24 puits
5 jusqu'à confluence (1×10^5 cellules / puit) et déprivées en sérum pendant 24 h
après lavage avec un tampon PBS sans Ca^{2+} additionné de 0,2 % de sérum
albumine bovine (BSA) et de Bacitracine (100 mg / ml, Sigma), les cellules sont
incubées à 25°C pendant 120 min avec le marqueur radioactif (I^{125}) en présence ou
10 en absence d'un excès (10^{-6} M) de AM non radiomarquée. Le marquage à l'iode de
AM humaine (Amh) synthétique est réalisée par la méthode à la chloranine T et le
produit est purifié par chromatographie liquide à haute performance en phase
inverse. De l'Amh moniodée (I^{125}) (SA, 350 Ci / mmol) est utilisée dans les
expériences. Dans les études d'inhibition de reconnaissance (de l'anglais "binding"),
les cellules sont incubées avec le marqueur radiomarqué et des concentrations
15 croissantes d'anticorps anti-AM. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont
lavées avec du PBS froid contenant 0,2 % de BSA, solubilisées avec de l'hydroxyde
de sodium 0,2 M, et la radioactivité retenue est mesurée par un spectromètre- γ . La
fixation spécifique est obtenue par soustraction de la mesure de la reconnaissance
non spécifique obtenue en présence d'Amh non marquée en excès de la mesure de
20 la reconnaissance totale. Les données représentent la moyenne de trois
expériences, chacune réalisée trois fois.

Animaux.

Des souris NMRI mâles (Nu / Nu) athymiques de 4 à 5 semaines (Janvier,
Laval Le Genest, France), sont placées dans des cages stériles sous flux laminaire
25 fermé, en température contrôlée et avec des périodes de 12 h de lumière et 12 h
d'obscurité, et alimentées et désaltérées *ad libitum*.

Thérapie anti-tumorale *in vivo*.

Des cellules U87 (3×10^6 cellules / souris) en phase exponentielle de
croissance sont injectées en sous-cutané dans les flancs des souris athymiques.
30 Après deux semaines, les tumeurs ont grossi jusqu'à un volume d'environ 1350 ± 170 mm³.
Le traitement est initié après 14 jours. L'anticorps anti-AM AMAb2 (200 μ g
d'IgG purifié) est injecté dans la tumeur (20 souris) dans un volume de 0,2 ml, deux
fois par semaine. Un contrôle négatif, un anti-IgG de lapin dirigé contre le peptide
dérivé du précurseur de l'endothéline de rat ou le tampon phosphate (PBS) seul
35 sont utilisés. Chaque groupe contrôle comporte sept souris. Chaque souris dans les

groupes traités par immunoglobuline reçoit un total de 400 µg d'immunoglobuline par semaine pendant la durée du traitement. Les tumeurs sont mesurées deux fois par semaine pendant le traitement. Le volume des tumeurs est calculé selon la formule volume = longueur x largeur x hauteur x 0,5236 (pour une forme elliptique).

5 Les données sont exprimées en moyenne +/- SEM. Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant la méthode ANOVA suivie par le test de différence significative de Fisher (Statview 512, Brain Power Inc., Calabasas, CA, USA). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Expression d'ARNm de PAM dans les cellules gliomales humaines.

10 L'ARN total de gliome humain, de lignées cellulaires de gliome humain et de tissu de cerveau normal est préparé pour analyser le niveau d'expression de PAM. Avec une sonde de 2,2 kilobases (kb), le transcript correspondant à la PAM est mis en évidence par Northern Blot à 4 kb. Un fort niveau d'expression est mis en évidence dans le gliome humain (Fig. 1A) et les lignées cellulaires (Fig. 1B) en
15 comparaison des tissus normaux. Après décrochage des membranes, un second marquage est réalisé avec la sonde ADNc préparée à partir d'ARNr 18S. Dans les gliomes, le niveau d'expression de PAM, quantifié et normalisé par rapport à l'ARN ribosomal 18S, apparaît être corrélé à l'agressivité de la tumeur. Les niveaux d'ARNm PAM sont 9 à 15 fois plus élevés dans les glioblastomes malins et 4 à 6
20 fois plus élevés dans les gliomes de faible degré que dans les tissus de cerveau normal. La majorité des lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains expriment de façon constante de hauts niveaux d'ARNm de PAM (Fig. 1B).

Activité PAM dans les lignées de cellules.

L'activité d'amidation des extraits de chaque lignée cellulaire est testée en
25 utilisant un substrat α -N-acetyl-Tyr-Val-Gly à pH 5,5. Les lignées cellulaires U373 et SW1783 gliome de haut degré présentent des niveaux d'activité PAM plus élevés (77 +/- 4 pmol / mg de protéine / h) que les lignées U87, U138 et SW1088 (55 +/- 4,3 pmol / mg de protéine / h). L'expression de PAM à la fois dans les tumeurs et les lignées gliomales démontre leur capacité à produire des peptides α -amidés.

Expression de l'ARNm de AM dans les lignées cellulaires.

30 L'expression de différents peptides α -amidés connus pour avoir des propriétés mitogènes sur les cellules tumorales est analysée par RT-PCR dans différentes lignées de gliomes. Parmi tous les peptides analysés, AM présente un niveau d'expression très élevé. Le niveau d'expression de l'ARNm AM est analysé
35 par Northern Blot sur des lignées gliomales et des tissus normaux humains

(Biochem. Biophys. Res. Commun., 194 : 720-725, 1993). La taille du transcript est d'environ 1,6 kb. La quantité d'ARNm de AM est ensuite normalisée par rapport à la quantité d'ARN ribosomal 18S (Fig. 2). Toutes les lignées cellulaires gliomales testées expriment l'ARNm de AM, tandis qu'aucune expression n'est détectée dans les tissus non tumoraux.

Production et sécrétion de AM dans les lignées cellulaires.

L'immunomarquage anti-AM est positif dans les extraits cellulaires et le milieu de culture. Toutes les lignées gliomales produisent donc et sécrètent de l'AM. La quantité d'AM obtenue est indiquée dans le tableau 2 figurant en annexe de la présente demande de brevet.

Expression de l'ARNm de AM dans le gliome humain.

De l'ARN total est préparé à partir de prélèvements de tumeurs de 25 gliomes comprenant 13 gliomes de haut degré (IV), 5 gliomes de bas degré (II) et 7 oligodendrogliomes anaplasiques. Les niveaux d'expression de l'ARNm de AM sont indiqués sur la figure 3. La quantification des transcripts d'ARNm de AM révèle un plus fort niveau d'expression de l'ARNm de AM dans les glioblastomes, comparés aux oligodendrogliomes de bas degré ou anaplasiques.

Expression des ARNm de RAMP et CRLR dans les lignées cellulaires.

Pour déterminer si les gliomes humains et les lignées cellulaires expriment CRLR, RAMP2 et RAMP3, une analyse par Southern Blot des produits de RT-PCR est réalisée. L'analyse des produits avec les sondes correspondantes révèle des bandes aux tailles attendues (tableau 1) correspondant à l'ARNm codant pour CRLR ainsi que RAMP2 et RAMP3. Aucune bande n'apparaît dans les contrôles sans transcriptase inverse.

Caractérisation de l'anticorps anti-AM.

L'anticorps anti-AM polyclonal (sérum ou IgG purifié) reconnaît bien AM pleine taille mais ne montre aucune réactivité croisée avec des peptides apparentés à AM, tel que cela apparaît sur le tableau 3 figurant en annexe de la présente demande de brevet. La calcitonine, CGRP₁₋₃₇, CGRP₈₋₃₇ et l'amyline ne montrent qu'une fixation non significative avec l'anticorps. De plus, aucune réaction croisée avec les peptides ACTH (humaine 1-24), endotheline-1 (humaine), AVP (humaine), CRF (humaine), TRH, substance P, ANF (humaine) n'est observée.

La capacité de l'anticorps à bloquer la fixation de AM-I¹²⁵ sur son récepteur dans des cellules U87 est testée (Fig. 4). L'anticorps bloque l'interaction récepteur – AM de façon dose dépendante.

Effets de AM et de l'anticorps anti-AM sur la prolifération des cellules U87 et U373 *in vitro*.

Des cellules U87 et U373 sont cultivées en présence de AM 2×10^{-7} M, et les effets du peptide sur la prolifération cellulaire sont examinés par une méthode MTT. Les figures 5A et 5B montrent que AM, à une concentration de 2×10^{-7} M, stimule la prolifération de cellules U87 de 15 % ($p < 0,02$) et U373 de 20 % ($p < 0,001$) après 8 jours de traitement.

Un anticorps anti-AM polyclonal (purifié IgG) est testé pour son effet inhibiteur sur la prolifération des cellules U87 et U373 cultivées en présence d'anticorps. Après 7 jours de traitement, l'anticorps à une concentration de 12 $\mu\text{g} / \text{ml}$ inhibe la prolifération de U87 et U373 de 33 % ($p < 0,002$) et de 50 % ($p < 0,001$) respectivement (Fig. 5A et 5B).

Effets de l'anticorps anti-AM *in vivo* sur des souris présentant des tumeurs.

La capacité de l'anticorps anti-AM à inhiber la croissance *in vivo* a été testée sur des cellules U87 xénogreffées sur souris. Six jours après inoculation dans les souris, la lignée cellulaire produit une masse tumorale palpable ($506 \pm 70 \text{ mm}^3$). Au 14^{ème} jour ($1\,350 \pm 170 \text{ mm}^3$), les tumeurs sont soumises à trois traitements :

tampon de PBS,

IgG de spécificité non relevante,

anticorps anti-AM (IgG purifié).

La figure 6 montre les courbes de croissance de tumeurs de souris porteuses d'un glioblastome humain U87, qui sont traités tous les trois jours avec l'anticorps anti-AM, ou le contrôle IgG non relevante. Le traitement est administré par injection intra-tumorale et la croissance est déterminée en fonction du volume tumoral au cours du temps. Après 21 jours de traitement avec l'anticorps à une dose de 200 μg deux fois par semaine, le volume moyen de la tumeur est réduit à $646 \pm 166 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$) par comparaison avec le groupe de contrôle qui atteint un volume de tumeur de $2\,150 \pm 160 \text{ mm}^3$. Des injections de l'anticorps pendant 7 semaines conduisent à une très forte diminution de la croissance tumorale, une régression de la tumeur (masse tumorale inférieure à 40 mm^3 chez toutes les souris) ainsi qu'une augmentation significative du nombre de survivants. Le volume tumoral moyen à la fin de l'expérience représente 2 % du volume tumoral moyen initial. La croissance des tumeurs chez les souris des groupes de contrôle a conduit au sacrifice des animaux moins de 6 semaines après l'injection des cellules. Les poids moyens des tumeurs dans les contrôles et les souris traitées avec l'anticorps

étaient de 3,8 +/- 0,5 g et 1,18 +/- 0,3 g respectivement ($p < 0,001$) après 20 jours de traitement. La diminution du poids des tumeurs est de 68,9 % et 91,5 % après 24 et 42 jours de traitement respectivement chez les animaux traités avec l'anticorps, en comparaison avec les groupes de contrôle.

ANNEXE

TABLEAU 1

Amorces utilisées pour la détection de l'expression de CRLR, RAMP2 et RAMP3.

Cible	Espèce	Séquence	Taille	T de fixation des amorces	Référence
CRLR	Humain	Sens (850-873) 5'-GTAATGTTAACACCCACGAGAAAG-3'	405 bp	50°C	U17473
		Antisens (1232-1254) 5'-ATCCCCAGCCCAAGAAAATAATAC-3'			
		Sonde (1095-1117) 5'-TGGGACACTTTGCAACTAACAG-3'			
RAMP2	Humain	Sens (1-20) 5'-GGATATAGGCGCCCCACAC-3'	402 bp	58°C	AJ001015
		Antisens (380-402) 5'-GGAAGCCCGAGGTCAAACAACCTCT-3'			
		Sonde (233-256) 5'-GGGGACCGGTGAAGAACTATGAGAC-3'			
RAMP3	humain	Sens (447-466) 5'-CGCAGCAAACGCACCCGACAC-3'	465 bp	58°C	AJ001016
		Antisens (888-911) 5'-GAGCCAGGCGCAGGAACCCAGAGATG-3'			
		Sonde (691-712) 5'-TCTAGGGCCAGTGGAGGAAAAT-3'			

La référence correspond au numéro Genbank.

ANNEXE

TABLEAU 2

Quantité de AM dans les extraits cellulaires et le milieu de culture des lignées cellulaires gliomales.

	Quantité dans les cellules (fmol / mg de protéine)	Quantité dans le milieu de culture (fmol / ml / h)
U87	2,312 +/- 0,256	0,415 +/- 0,014
U138	2,564 +/- 0,288	0,148 +/- 0,044
SW1088	5,398 +/- 0,127	0,488 +/- 0,011
U373	2,583 +/- 0,250	0,231 +/- 0,012
SW1783	9,892 +/- 0,101	0,104 +/- 0,013

ANNEXE

TABLEAU 3

Réactivité de l'anticorps anti-AM avec des peptides apparentés.

Peptide	% de réactivité
AM (humain, 1-52)	100
AM (humain, 22-52)	10
AM (humain, 26-52)	9
AM (humain, 13-37)	1
CGRP (humain, 1-37)	< 0,1
CGRP (humain, 8-37)	< 0,1
Amyline	0

REVENDEICATIONS

1. Anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM humaine.
5
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est monoclonal ou polyclonal.
3. Anticorps polyclonal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est
10 préparé en utilisant des animaux, par exemple des souris, des chèvres, des lapins.
4. Anticorps monoclonal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est
15 préparé par recombinaison génétique, à partir de banques de cellules souches humaines ou par la technique de "phage display".
5. Anticorps selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est chimérique et
préparé en utilisant des anticorps monoclonaux humains comportant des
20 parties variables de souris ou d'autres espèces spécifiques de l'AM humaine.
6. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce
qu'il est un agent anti-prolifération tumorale et/ou un agent anti-angiogénèse.
7. Composition pharmaceutique comprenant en tant que principe actif un
25 anticorps, ou un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM humaine.
8. Composition selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'elle comprend un
anticorps anti-AM selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- 30 9. Composition selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle
administrée par voie injectable, notamment par voie intra-veineuse, sous-
cutanée, ou par administration dans le réseau lymphatique.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend de 1 µg à 1g, avantageusement de 10 mg à 100 mg de principe actif.
- 5 11. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
12. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, destinée au traitement du cancer de la prostate, du cancer des ovaires, des
10 neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.
13. Anticorps, ou un fragment de celui-ci, capable de reconnaître la protéine AM
15 humaine, pour utilisation en tant que principe actif d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
14. Anticorps selon la revendication 13, pour le traitement du cancer de la
20 prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.
- 25 15. Utilisation d'un anticorps, ou d'un fragment de celui-ci, spécifique de la protéine AM humaine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de cancers et/ou de cellules tumorales.
16. Utilisation selon la revendication 15, pour le traitement du cancer de la
30 prostate, du cancer des ovaires, des neuroblastomes, des glioblastomes, le cancer du poumon, l'adénocarcinome, le carcinome bronchoalvéolaire, le carcinome de cellules squameuses, les carcinoïdes pulmonaires, le ganglioneuroblastome.

17. Utilisation de l'AM dans un test biologique, pour la mise en évidence de composés capables de moduler l'action de l'AM sur l'angiogénèse ou la croissance tumorale.
- 5 18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le test comprend les étapes consistant à
- c) mettre en contact un composé candidat avec des cellules qui expriment l'AM ou répondent à l'AM, et
- 10 d) observer la fixation, ou la stimulation ou l'inhibition d'une réponse fonctionnelle, ou comparer la réponse des cellules mises en contact avec le composé candidat avec les mêmes cellules qui ne sont pas mises en contact avec le composé candidat.

1/6

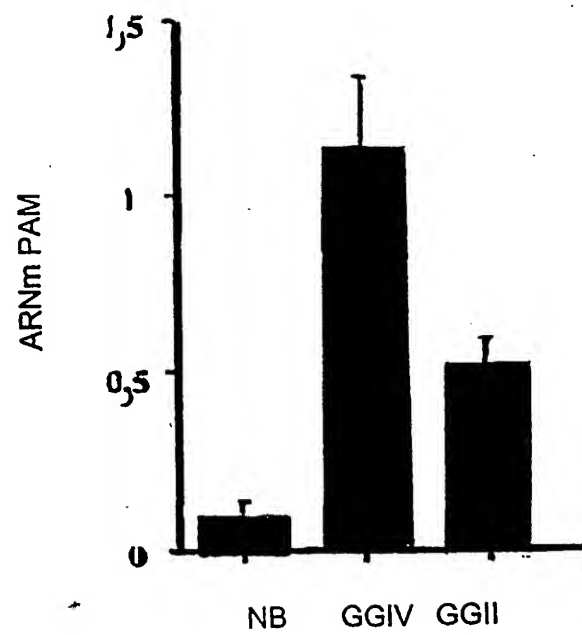


Fig. 1A

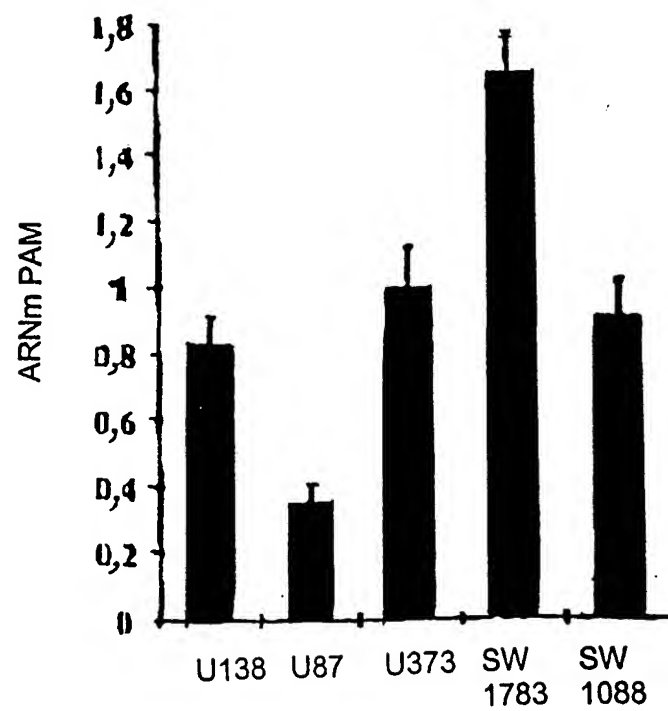


Fig. 1B

2/6

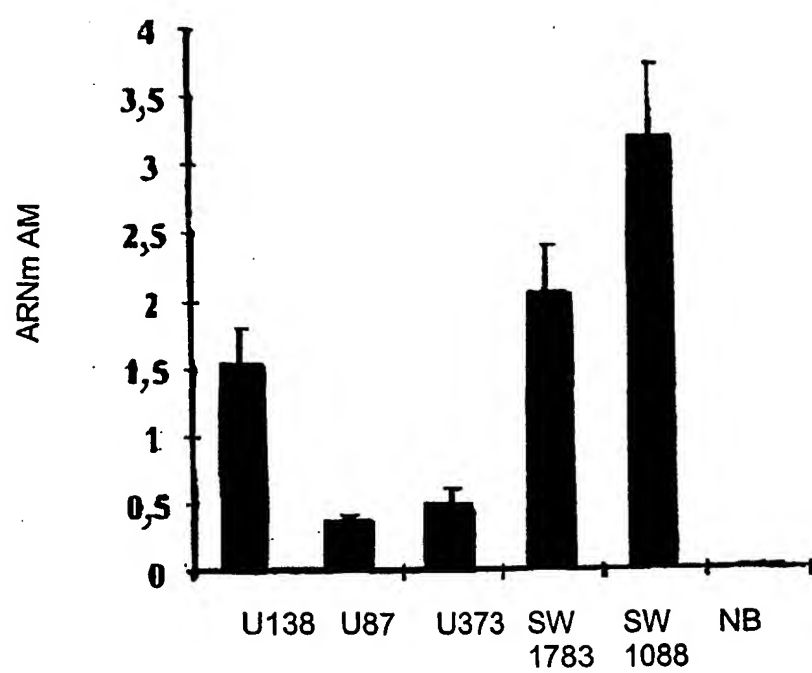
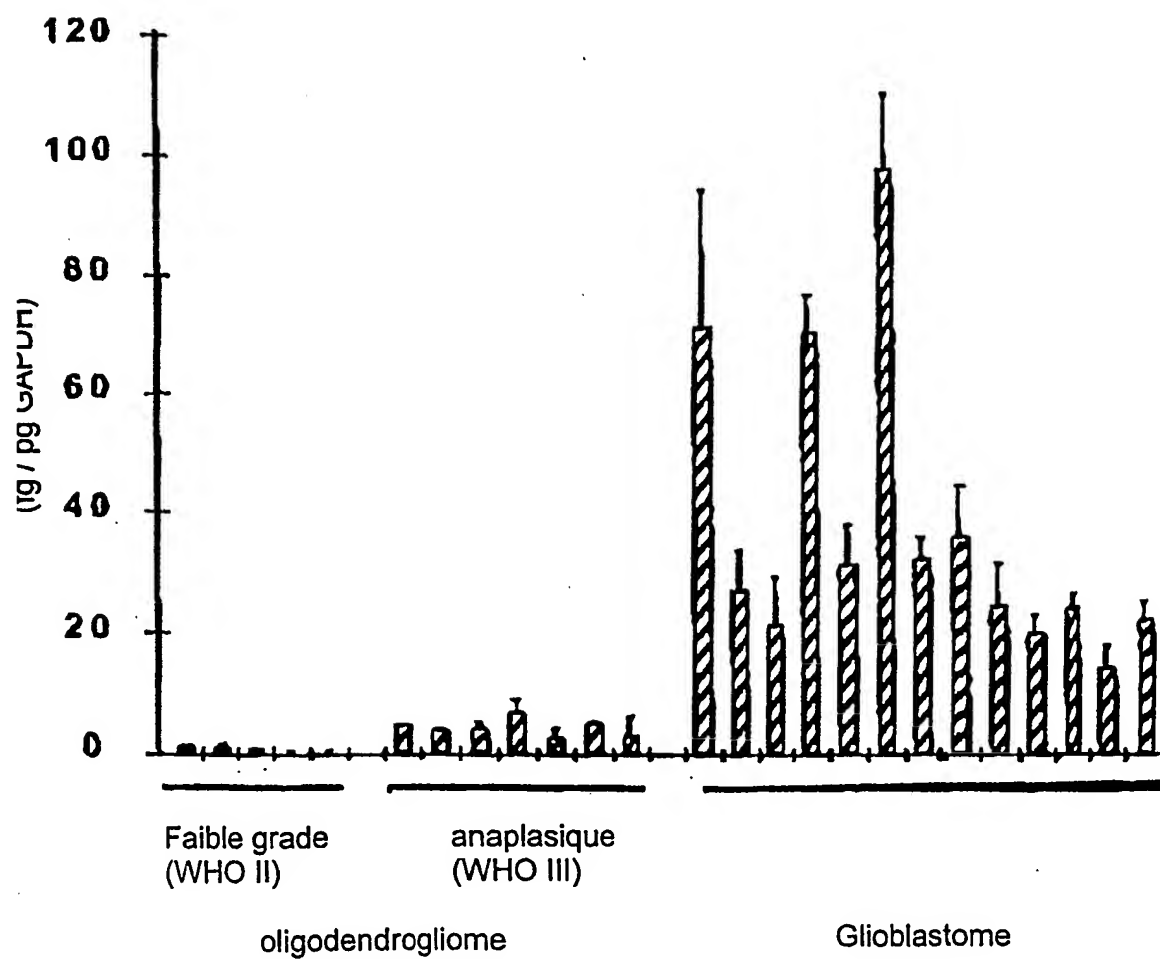


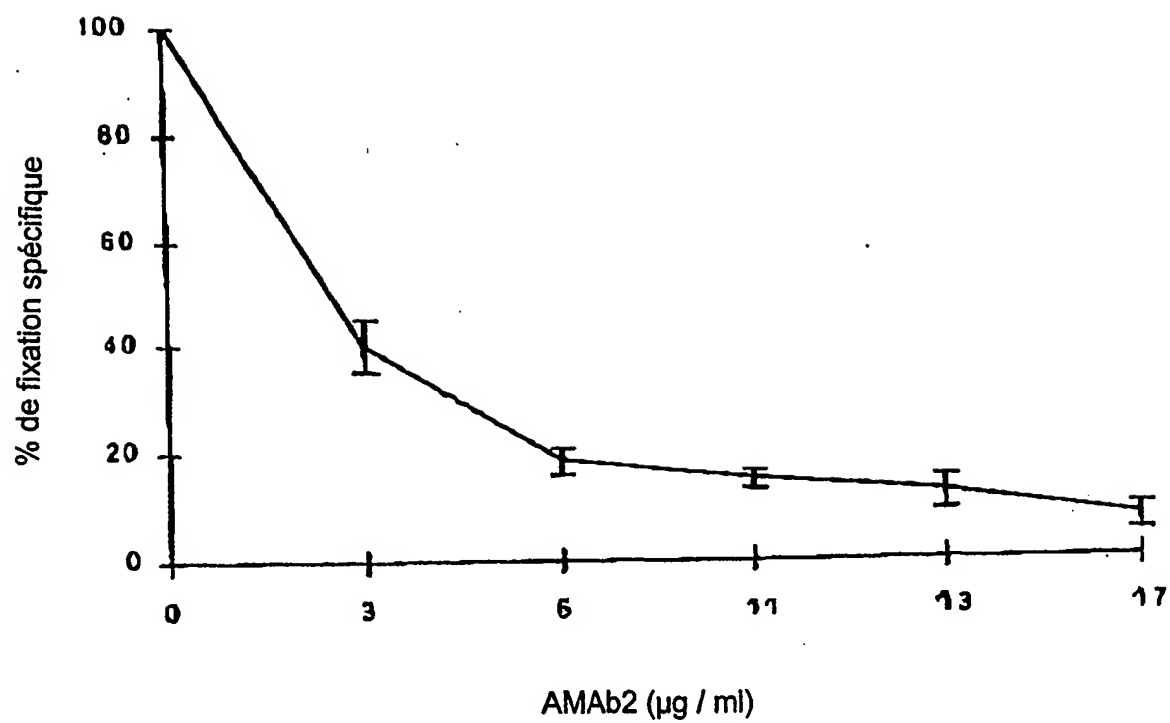
Fig. 2

Fig. 3



4/6

Fig. 4



5/6

Fig. 5A

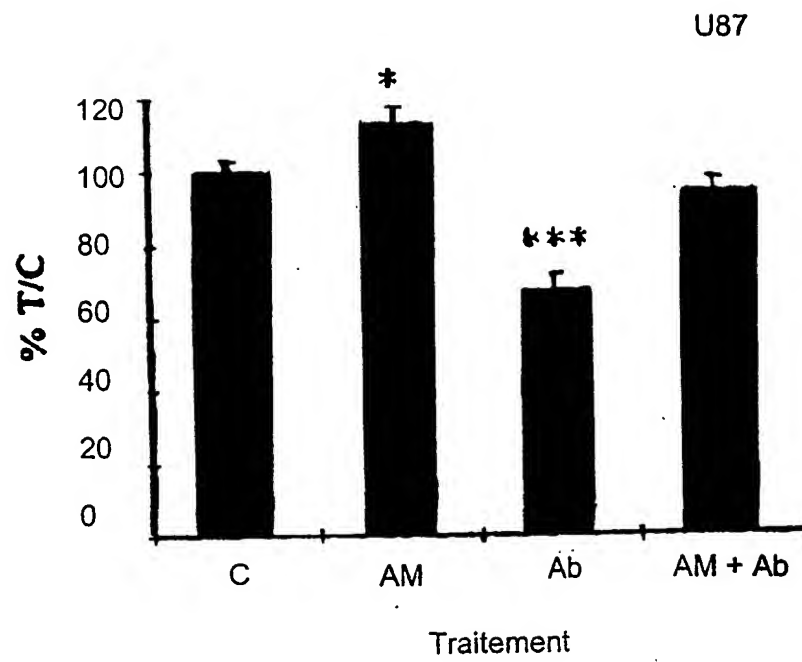
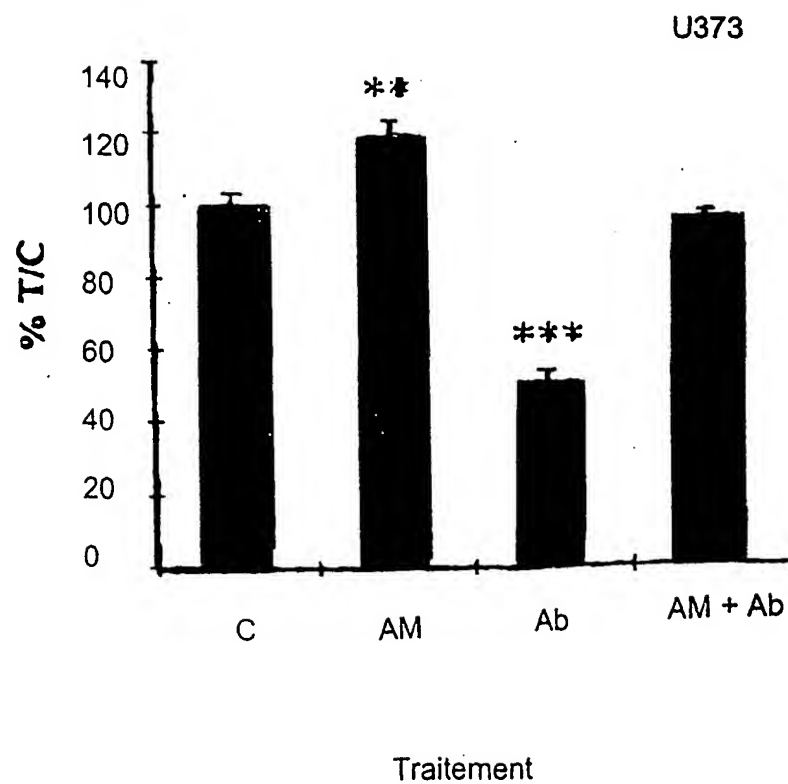


Fig. 5B



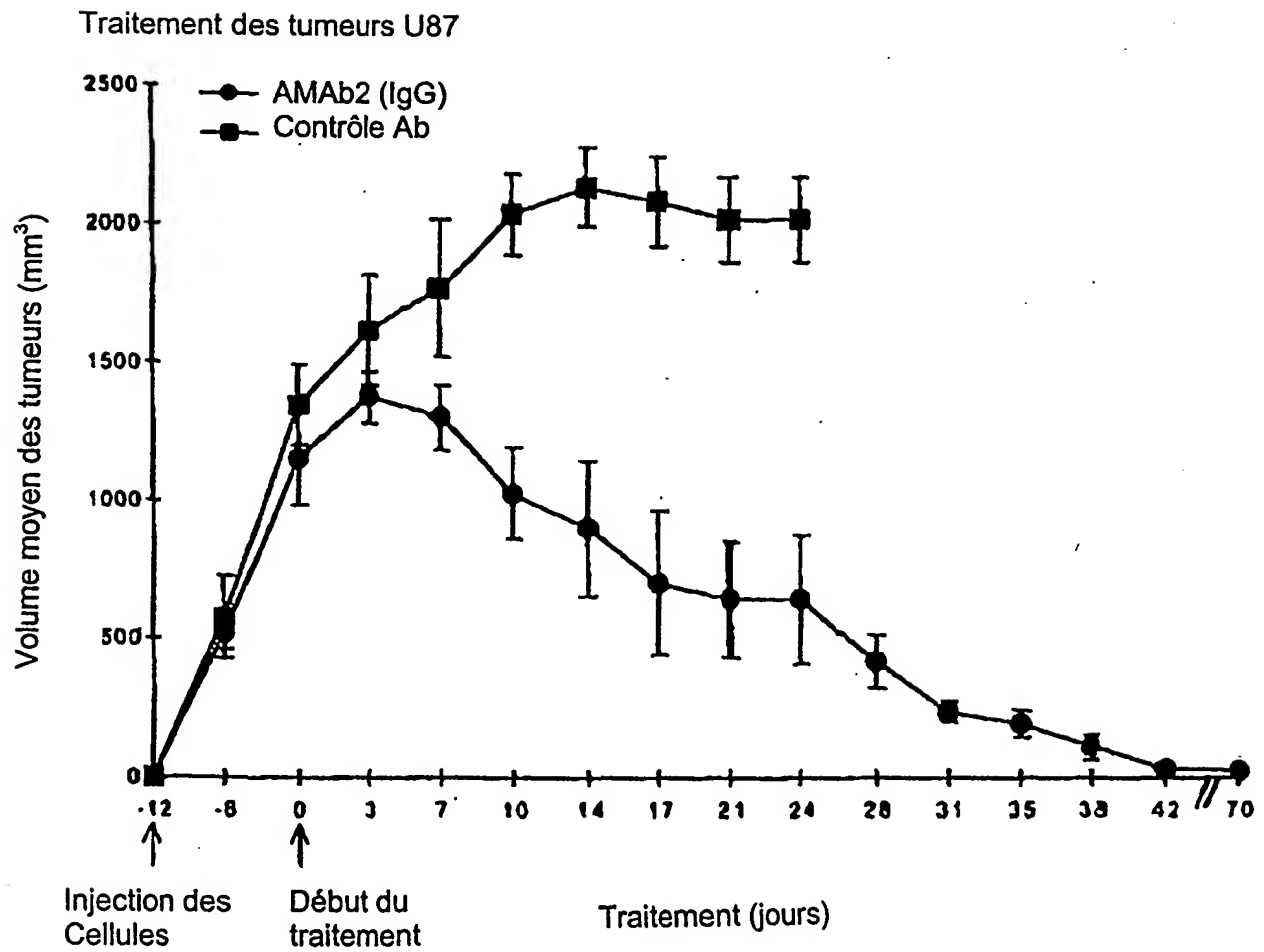


Fig. 6

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 août 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/066492 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 16/22, A61K 39/395, A61P 35/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00638

(22) Date de dépôt international :
20 février 2002 (20.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/02291 20 février 2001 (20.02.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
SANOFI-SYNTHELABO [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). **ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE MARSEILLE** [FR/FR]; 80, rue brochier, F-13005 Marseille (FR).

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 27 février 2003

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **Martin, Pierre, Marie** [FR/FR]; 79, avenue de Montredon, F-13008 Marseille (FR). **OUAFIK, L'Houcine** [FR/FR]; 11, rue Louis Braille, F-13005 Marseille (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(74) Mandataire : **MONAIN, Patrice**; Sanofi-Synthélabo, 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(54) Title: HUMAN ADRENOMEDULLIN-SPECIFIC ANTIBODY, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME, THERAPEUTIC USES THEREOF

(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUE DE L'ADRENOMEDULLINE HUMAINE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT, SES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.

(57) Abstract: The invention concerns an adrenomedullin-specific antibody, for use in cancer treatment. The invention also concerns pharmaceutical compositions containing an anti-adrenomedullin antibody and their therapeutic uses.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à un anticorps spécifique de l'adrénomedulline, utile dans le traitement de cancers. L'invention se rapporte également à des compositions pharmaceutiques contenant un anticorps anti-adrénomedulline et à leurs applications thérapeutiques.



WO 02/066492 A3

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/22 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 07214 A (UNSWORTH EDWARD J ;MACRI CHARLES (US); US HEALTH (US); CUTTITTA FR) 27 February 1997 (1997-02-27) claims 1-16	1-5,7-18
X	--- ZHAO YUAN ET AL: "PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium." ONCOGENE, vol. 16, no. 3, 22 January 1998 (1998-01-22), pages 409-415, XP001113057 ISSN: 0950-9232 page 410, left-hand column, line 54 -right-hand column, line 5 --- -/--	1-18



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2002

Date of mailing of the international search report

29/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILLER MAE JEAN ET AL: "Adrenomedullin expression in human tumor cell lines: Its potential role as an autocrine growth factor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 38, 1996, pages 23345-23351, XP002184272 ISSN: 0021-9258 the whole document ----	1-5,7-18
X	EP 0 622 458 A (KANGAWA KENJI ; SHIONOGI & CO (JP)) 2 November 1994 (1994-11-02) claims 45-53 ----	1-5
A	BORGSTROM P ET AL: "COMPLETE INHIBITION OF ANGIOGENESIS AND GROWTH OF MICROTUMORS BY ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR NEUTRALIZING ANTIBODY: NOVEL CONCEPTS OF ANGIOSTATIC THERAPY FROM INTRAVITAL VIDEOMICROSCOPY" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 56, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 4032-4039, XP002918735 ISSN: 0008-5472 the whole document -----	6,17,18

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9707214	A	27-02-1997	AT 180832 T	15-06-1999
			AU 710662 B2	23-09-1999
			AU 6776596 A	12-03-1997
			CA 2229741 A1	27-02-1997
			DE 69602756 D1	08-07-1999
			DE 69602756 T2	10-02-2000
			EP 0845036 A1	03-06-1998
			JP 11512087 T	19-10-1999
			US 6320022 B1	20-11-2001
			WO 9707214 A1	27-02-1997
			US 2002055615 A1	09-05-2002
EP 0622458	A	02-11-1994	JP 2774769 B2	09-07-1998
			JP 7196693 A	01-08-1995
			AU 678212 B2	22-05-1997
			AU 6064894 A	27-10-1994
			CA 2122112 A1	27-10-1994
			EP 0622458 A2	02-11-1994
			US 5910416 A	08-06-1999
			US 5639855 A	17-06-1997
			US 5837823 A	17-11-1998
			US 5830703 A	03-11-1998

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K16/22 A61K39/395 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 07214 A (UNSWORTH EDWARD J ;MACRI CHARLES (US); US HEALTH (US); CUTTITTA FR) 27 février 1997 (1997-02-27) revendications 1-16 ---	1-5, 7-18
X	ZHAO YUAN ET AL: "PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium." ONCOGENE, vol. 16, no. 3, 22 janvier 1998 (1998-01-22), pages 409-415, XP001113057 ISSN: 0950-9232 page 410, colonne de gauche, ligne 54 -colonne de droite, ligne 5 --- -/-	1-18



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 octobre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/10/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MILLER MAE JEAN ET AL: "Adrenomedullin expression in human tumor cell lines: Its potential role as an autocrine growth factor."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 38, 1996, pages 23345-23351, XP002184272</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>le document en entier</p> <p>----</p>	1-5, 7-18
X	<p>EP 0 622 458 A (KANGAWA KENJI ; SHIONOGI & CO (JP)) 2 novembre 1994 (1994-11-02) revendications 45-53</p> <p>----</p>	1-5
A	<p>BORGSTROM P ET AL: "COMPLETE INHIBITION OF ANGIOGENESIS AND GROWTH OF MICROTUMORS BY ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR NEUTRALIZING ANTIBODY: NOVEL CONCEPTS OF ANGIOSTATIC THERAPY FROM INTRAVITAL VIDEOMICROSCOPY"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 56, 1 septembre 1996 (1996-09-01), pages 4032-4039, XP002918735</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	6, 17, 18

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9707214	A	27-02-1997	AT 180832 T	15-06-1999
			AU 710662 B2	23-09-1999
			AU 6776596 A	12-03-1997
			CA 2229741 A1	27-02-1997
			DE 69602756 D1	08-07-1999
			DE 69602756 T2	10-02-2000
			EP 0845036 A1	03-06-1998
			JP 11512087 T	19-10-1999
			US 6320022 B1	20-11-2001
			WO 9707214 A1	27-02-1997
			US 2002055615 A1	09-05-2002
EP 0622458	A	02-11-1994	JP 2774769 B2	09-07-1998
			JP 7196693 A	01-08-1995
			AU 678212 B2	22-05-1997
			AU 6064894 A	27-10-1994
			CA 2122112 A1	27-10-1994
			EP 0622458 A2	02-11-1994
			US 5910416 A	08-06-1999
			US 5639855 A	17-06-1997
			US 5837823 A	17-11-1998
			US 5830703 A	03-11-1998